世界知的所有権機關

PCT

国際事務局



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6

C12N 15/87, 5/10, C07K 14/78

(11) 国際公開番号

WO96/17073

A1

(43) 国際公開日

1996年6月6日(06.06.96)

(21) 国際出頭番号

PCT/JP95/02425

(22) 国際出版日

1995年11月29日(29.11.95)

(30) 優先権データ

特顯平6/317721

1994年11月29日(29.11.94)

JP

(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)

管酒造株式会社

(TAKARA SHUZO CO., LTD.)[JP/JP]

〒612 京都府京都市伏見区竹中町609番地 Kyoto, (JP)

(72) 発明者;および

(75) 発明者/出版人(米国についてのみ)

福野仁一(HASHINO, Kimikazu)[JP/JP]

〒569 大阪府高槻市明野町27-3 Osaka, (JP)

松下秀之(MATSUSHITA, Hidoyuki)[JP/JP]

〒525 滋賀県草津市西渋川2丁目12-1

ハーモパレス草準401号 Shiga, (JP)

加藤郁之進(KATO, Ikunoshin)[JP/JP]

〒611 京都府宇治市南陵町1-1-150 Kyoto, (JP)

(74) 代理人

弁理士 青山 葆,外(AOYAMA, Tamotau et al.) 〒540 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル青山特許事務所 Osaka, (JP)

(81) 指定国

AL, AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, UG, US, UZ, VN, 欧州特件(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特件(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特件(KE, LS, MW, SD, SZ, UG).

添付公開書類

国際調査報告書

(54) Tise: PROCESS FOR PRODUCING TRANSFORMED CELL

(54) 発明の名称 形質転換細胞の製造方法

(57) Abstract

A process for producing transformed cells by introducing foreign genes into target cells through piercing, which comprises the step of culturing the target cells having the foreign genes injected thereinto in the presence of a cell adhesion-active substance; and a kit for producing transformed cells suitable for use in the above method and containing as the essential ingredients the cells to be transformed with foreign genes by this method and a cell adhesion-active substance.

(57) 要約

穿孔法を用いて外来遺伝子を標的細胞に導入し、形質転換細胞を製造するに際し、標的細胞内に外来遺伝子の注入操作を行った後、該細胞を細胞接着活性物質の存在下で培養する工程を包含する外来遺伝子による形質転換細胞の製造方法、該方法によって製造される外来遺伝子による形質転換細胞および細胞接着活性物質を必須の構成成分とする該方法で使用するに適した形質転換細胞製造用キットを開示する。

情報としての用途のみ P.C.Tに基づいて公開される国際出版をパンフレット第一頁にP.C.T加盟国を同定するために使用されるコード PT ポルトガル LR LS LU LV スリランカリベリア ルーマニア ナンマーク RO DK ロシア連邦 アルパニア エストニア RU EES レソト スペインフィンランドフランス スーダン アルメニア SD AM リトアニア スウェーデン オーストリア ŠĒ ルクセンブルグ AT オーストラリア シンガポール ラトヴィア FR スロヴェニア ナセルバイジャン SISK AZBB ガポン GA スロヴァキア共和国セネガルスワジランド MC モナコ バルバドス イギリスグルジア モルドバ GB MD ベルギー BE ĞĒ マダガスカル ブルギナ・ファソ MG SZ マケドニア日ユーゴ BF ギニア GN チャード ブルガリア MK スラヴィア共和国マリ キリシャ TD GR ŤĠ ベナン ハシガリー BJ クジキスタン HÜ ML ブラジル ベラルーシ Ť Ĵ TM アイルランド IE モンゴル トルクメニスタン BR. MN ティスランド モーリクニアマラウイメキシコ トリニダード・トバゴ MR カナダ TR イタリー 中央アフリカ共和国 MW トリニグード・トハコ ウクライナ ウガンダ 米国 ウスペキスタン共和国 ヴィェトナム j P KE KG は木ケニア MX コンゴー ÜA CG キルギスタン 朝鮮民主主義人民共和国 大韓民国 カザフスタン ニジェール NE ŪG スイス CH オランダ コート・ジボアール NL US UZ VN KP KR KZ LI ノルウェー NO ニュー・ジーランドボーランド カメルーン CM NZ 中国 CN チェッコ共和国 ドイツ **ジェテンシュタイン** CZDE

1

明細書

形質転換細胞の製造方法

技術分野

本発明は、形質転換細胞の製造方法、さらに詳しくは、細胞工学、遺伝子工学、発生工学などの分野において標的細胞への外来遺伝子導入を効率 良く行うことを可能にする方法に関する。

背景技術

標的細胞内への外来遺伝子導入方法には、リン酸カルシウム法、DEA Eーデキストラン法、リボソーム法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法などが知られている。いずれの方法も操作法、効率、細胞に対するダメージなどの点で一長一短がある。中でもエレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法等の穿孔法は、特別な試薬を用いることなく細胞の取扱いが可能であり、導入効率も良好である。しかしながら、穿孔による細胞のダメージは免れない。

本発明の目的は、穿孔法により標的細胞内へ外来遺伝子を導入して形質 転換細胞を製造する際の、導入効率を向上させる方法を提供することにある。さらに、該方法に用いるキットを提供することも目的とする。

発明の概要

本発明の第1の発明は形質転換細胞の製造方法に関する発明であって、 穿孔法を用いて形質転換細胞を製造する方法において、穿孔法を用いて標 的細胞内に外来遺伝子の注入操作を行った後、該細胞を細胞接着活性物質 の存在下で培養する工程を包含することを特徴とする。

本発明の第2の発明は、本発明の製造方法で製造される外来遺伝子による形質転換細胞に関する発明である。

また、本発明の第3の発明は、形質転換細胞製造用キットに関する発明であって、上配第1の発明の形質転換細胞の製造方法に使用するキットであって、細胞接着活性物質を含有することを特徴とする。

発明の詳細な説明

本発明の方法は、穿孔法を用いて標的細胞に外来遺伝子を導入した後に、細胞接着活性を有する物質の存在下この細胞を培養することを特徴とする。

本発明において穿孔法とは、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法等であり、細胞壁の穿孔により、遺伝子を注入する方法である。エレクトロポレーション法とは、例えば、蛋白質、核酸、酵素、第31巻、第1591~1603頁(1986)に記載の方法であり、マイクロインジェクション法とは、例えば、セル(Cell)、第22巻、第479~488頁(1980)に記載の方法であり、パーティクルガン法とは、例えば、テクニーク(Technique)、第3巻、第3~16頁(1991)に記載の方法であり、細胞に遺伝子を導入する方法として使用する公知の方法を包含する。

これらの穿孔法で使用される細胞としては、例えば、動物細胞を公知 [日本生化学会編: "新生化学実験講座18 細胞培養技術"、(第1版) (1990)東京化学同人発行]の方法で調製すれば良く、また、培養動 物細胞を使用しても良い。

細胞接着活性物質とは、細胞接着活性、すなわち標的細胞を細胞、あるいは組織内にある細胞間を満たす物質である細胞外マトリックス、またプラスチックやガラスなどの器質に接着させる活性を有する物質をいい、本

発明においては、標的細胞の形質転換に悪影響を及ぼさない限り、いずれの該活性を有する物質も使用できる。かかる活性とは、細胞をその形態を保持して、あるいは伸展、すなわち一またはそれ以上の方向に細胞が伸び、その形態が変化した状態で、例えば細胞接着活性物質を被覆した培養器具に固定する活性である。

細胞接着活性物質と標的細胞の結合は慣用の方法を使用して同様にアッセイすることができる。例えば、このような方法にはネイチャー(Nature)、352:438~441(1991年)に記載された方法が含まれる。簡単に言えば、細胞接着活性物質はプラスチック皿上を被覆しており、そしてアッセイすべき細胞集団は培地に重層して30分から2時間置く。このインキュベーション期間後に、接着していない細胞を回収し、計数しそして生存性についてアッセイする。細胞接着活性物質と接着した細胞もトリプシンまたは細胞解離緩衝液(例えば、Gibco)を使用して回収し、計数しそして生存性を試験する。次に、接着細胞の割合を計算しそしてウシ血清アルブミン(BSA)被覆プラスチック皿のような標準乃至標準対照と比較する。標的細胞とアッセイした細胞接着活性物質の実質的な接着によって、細胞接着活性物質/細胞の組合せを決定できる。または細胞伸展活性は、上記操作中、接着した細胞をトリプシンまたは細胞解離緩衝液を用いて解離させる前にその形態変化を顕微鏡下で観察することによって測定することができる。

細胞接着活性物質としては、例えば、細胞接着活性ポリペプチドまたは 該ポリペプチドの機能的同等物や細胞接着合成ポリマーが挙げられる。

本発明に使用する細胞接着活性を有するポリペプチドとしては、例えば、インベイシン、ポリリジン等の細胞外マトリックス由来以外の細胞接着活性ポリペプチド、例えば、特開平2-311498号公報に記載の細胞伸

展活性を示すポリペプチド、例えば、フィブロネクチン、ラミニン、コラ ーゲン、ビトロネクチン、オステオポンチン、トロンボスポンジン、テネ イシン等の細胞外マトリックスの構成成分等がある。細胞外マトリックス 構成成分は公知の方法 [インターナショナル ジャーナル オブ キャン サー(International Journal of Cancer)、第20巻、第1~5頁(19 77)、ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (Journal of Biological Chemistry)、第254卷、第9933~9937頁(197 9)、日本生化学会編: "続生化学実験講座 第6巻 細胞骨格の構造と 機能(下)"、(第1版)(1986)東京化学同人発行、セル ストラ クチャー アンド ファンクション (Cell Structure and Function)、第 13巻、第281~292頁(1988)、ジャーナル オブ バイオロ ジカル ケミストリー、第264巻、第18202~18208頁(19 89)、ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー、第260巻、 第12240~12245頁(1985)]で、天然物、培養物より調製 することができる。細胞接着活性ポリペプチドとしては、実質的に純化さ れた細胞接着活性を示す細胞外マトリックス、実質的に純化された細胞外 マトリックスフラグメントまたはそれらの混合物でも良く、細胞接着活性、 細胞伸展活性を有するタンパク質、ポリペプチドおよびその機能的同等物 を使用することができる。

これらの細胞接着活性ポリペプチドは、実質的に純化された天然物を使用しても良く、その酵素学的、化学的分解物、またこれらの物質を遺伝子工学的に作成したものを使用しても良い。さらに、これらの物質の機能、すなわち細胞接着活性、細胞伸展活性を損なうことなく改変した物も使用することができる。なお本発明において、天然起源のポリペプチドのアミリ酸配列のアミノ酸が欠失、置換、付加および/または挿入のいずれか一

つがなされていても所望の細胞接着活性、細胞伸展活性を有するポリペプチドを天然アミノ酸配列を有するポリペプチドの機能的同等物という。すなわち、天然に存在するタンパク質にはそれをコードする遺伝子の多形や変異によりアミノ酸配列に変化が生じたものの他に、生成後のタンパク質の生体内および精製中の修飾反応などによって、そのアミノ酸配列中にアミノ酸の欠失、挿入、付加、置換等の変異が起こったものも含まれるが、それにも関わらず変異を有しないタンパク質と実質的に同等の生理、生物学的活性を示すものがあることが知られている。このように構造的に差異があっても、その主要な機能を共通にしていると認められるものを機能的に同等の活性を有するポリペプチドと呼ぶ。

人為的にタンパク質のアミノ酸配列に上記のような変異を導入した場合でも同様であり、この場合はさらに多種多様の変異体を作製することが可能であるが、変異を有しないものと実質的に同等の生理活性を示す限り、これらの変異体は機能的に同等の活性を有するポリペプチドと解釈される。

たとえば、大陽菌で発現されたタンパク質のN末端に存在するメチオニン残基は、多くの場合、メチオニンアミノペプチダーゼの作用により除去されるとされているが、タンパク質の種類によってはメチオニン残基を持つもの、持たないものの両方が生成される。しかしながら、このメチオニン残基の有無はタンパク質の活性に影響を与えない場合が多い。また、ヒトインターロイキン2(IL-2)のアミノ酸配列中の、あるシステイン残基をセリンに置換したポリペプチドがインターロイキン2活性を保持することが知られている[サイエンス(Science)、第224巻、1431頁(1984)]。

さらに、遺伝子工学的にタンパク質の生産を行う際には、融合タンパク質として発現させることがしばしば行われる。たとえば、目的のタンパク

質の発現量を増加させるために、目的のタンパク質のN末端に他のタンパク質由来のN末端ペプチド鎖を付加したり、目的のタンパク質のN末端、あるいはC末端に適当なペプチド鎖を付加して発現させ、この付加したペプチド鎖に親和性を持つ担体を使用することにより、目的のタンパク質の精製を容易にすることなどが行われている。

この点に関して、関連バイオテクノロジー技術は、対象の機能的領域中のアミノ酸の欠失、置換、付加または他の修飾を定型的に実施することができる状態にまで進歩している。次に、得られたアミノ酸配列は所望の細胞接着活性または細胞伸展活性について、上記の方法により定型的にスクリーニングすることができる。

細胞接着活性を有するポリペプチドは、分子内に細胞接着活性に必要なアミノ酸配列、例えば、配列表の配列番号1(RGDS)で表されるアミノ酸配列、配列表の配列番号2(CS1)で表されるアミノ酸配列、配列表の配列番号6(ラミニンの中心配列、YIGSR)で表されるアミノ酸配列より選択されるアミノ酸配列を含有する人工のポリペプチドでも良く、これらのポリペプチドは遺伝子工学的方法、化学合成方法で大量に調製でき、純化されたポリペプチドとして使用することができる。

分子内に配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列を有する人工のポリペプチドとしては、例えば、特開平1-180900号公報に記載の配列表の配列番号7で表されるポリペプチドがあり、該ポリペプチドは、Escherichia coli HB101/pTF1409 (FERM BP-1939)を用いて該公報に記載の方法により調製することができる。また、下記表1に示す各配列表の配列番号で表されるポリペプチドも、各公報記載の遺伝子工学的方法により調製することができる。

なお、表1中の Escherichia coli HB101/pCHV90が含有す

るプラスミド HB101/pCHV90は、Escherichia coli HB101/pHD101 (FERM BP-2264) および Escherichia coli JM109/pTF7021 (FERM BP-1941) を用い、特開平5-271291号公報記載の方法により調製することができる。

丧1

公開公報	配列表の	生産富	寄託番号
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	配列番号	(Escherichia coli)	•
· .			· ·
特開平1-206998号	配列番号8	JM109/pTF7021	FERM BP-1941
特開平1-261398号	配列番号9	HB101/pTF1801	FERM P-9948
特開平2-97397号	配列番号3	JN109/pTF7221	FERM BP-1915
特開平2-152990号	配列番号10	JN109/pTFB800	FERM BP-2126
特開平2-311498号	配列番号11	HB101/pCH101	FERN BP-2799
特開平3-59000号	配列番号12	JW109/pCF406	FERM P-10837
特開平3-232898号	配列番号13	HB101/pCE102	FERM P-11226
特開平4-54199号	配列番号14	JW109/pTF7520	FERM P-11526
		+VN-IN. TAA	*
	配列番号15	JM109/pTF7520	·
		+Col ^{x1}	FERM P-11527
特開平5-271291号	配列番号16	HB101/pCHV179	FERM P-12183
	配列番号17	HB101/pCHV90	· -
	配列番号18	HB101/pCHV89	FERM P-12182
特開平5- 97698号	配列番号19	JN109/pTF7520ColV	FERM BP-5277
特開平5-178897号	配列番号20	JM109/pYMH-CF · A	FERM BP-5278

PCT/JP95/02425 WO 96/17073

また、分子内に配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列を有する人工のポリペプチドは化学合成することもでき、例えば、特開平3-173828号公報に記載のポリRGDSを合成、使用しても良い。

分子内に配列表の配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を有する人工のポリペプチドとしては、例えば、特開平 2-311498 号公報に記載の配列表の配列番号 4 で表されるポリペプチドがあり、該ポリペプチドは Escherichia coli HB101/pHD102 (FERM P-10721)を用いて公報に記載の方法により遺伝子工学的に調製することができる。また、特開平 3-284700 号公報に記載の方法に従い、配列表の配列番号 2 で表されるポリペプチドを化学合成しても良い。

さらに、分子内に配列表の配列番号2で表されるアミノ酸配列および配列表の配列番号3で表されるアミノ酸配列を含有する人工のボリペプチドとしては、例えば、特開平2-311498号公報に記載の配列表の配列番号21で表されるボリペプチドがあり、該ボリペプチドは Escherichia coli HB101/pCH102(FERM BP-2800)を用いて公報に記載の方法により遺伝子工学的に調製することができる。また、特開平3-284700号公報に記載の配列表の配列番号5で表されるボリペプチドも分子内に配列表の配列番号1、2のアミノ酸配列を含有するボリペプチドであり、該ボリペプチドは Escherichia coli HB101/pCS25(FERM P-11339)を用いて公報に記載の方法により遺伝子工学的に調製できる。

以上のように、本発明に使用するポリペプチドの例としては、分子内に配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列および/または配列表の配列番号2で表されるアミノ酸配列を含有する細胞接着活性ポリペプチドがあり、該ポリペプチドとしては、例えば、ヒト・フィブロネクチンの細胞接

着ドメイン [モッシャー, D. F. (Nosher, D. F.) 編: "フィブロネクチン" (Fibronectin)、第47~121頁(1989)アカデミックプレス (Academic Press)発行]由来ポリペプチドと同CS1ポリペプチド(同上刊行物)が共有結合したもの、CS1ポリペプチドを含有するヘパリン結合ドメイン (同上刊行物)由来ポリペプチド、あるいは細胞接着由来ポリペプチドを使用することができ、これらはそれぞれ遺伝子工学的に作製することができる。例えば、細胞接着ドメイン由来ポリペプチドをコードするDNAを含むベクター、CS1ポリペプチドをコードするDNAを含むベクター、CS1ポリペプチドをコードするDNAを含むベクター、CS1ポリペプチドをコードするDNAを含むベクターから、それぞれ必要な領域を取出し、単独あるいは組合せて使用することにより、分子内に配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列および/または配列表の配列番号2で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドを発現するベクターを作製することができる。

分子内に配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドと分子内に配列表の配列番号2で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドが共有結合したポリペプチドを作製する場合、ポリペプチド間の共有結合は、直接結合であってもよく、間接結合、例えば、スペーサーを介した間接結合であってもよい。スペーサーは、各領域の分子間距離を調節するための挿入配列であり、任意のペプチド鎖を用いることができ、例えば、フィブロネクチン分子中のCS1領域の上流配列であってもよい。スペーサー配列は遺伝子工学的に容易に導入することができる。

細胞接着合成ポリマーとしては、例えば、公知のポリーNーpービニルベンジルーDーラクトンアミド (PVLA) が挙げられる。

本発明において、標的細胞は特に限定するものではないが、例えば、造

血幹細胞、末梢血幹細胞、臍帯血細胞、ES細胞、リンパ球、癌細胞等が 挙げられる。

外来遺伝子も、特に限定するものではなく、例えば、タンパク質をコードする核酸、ポリペプチドをコードする核酸、アンチセンスDNA、アンチセンスRNA、リボザイム、細胞内抗体をコードする核酸、偽(デコイ) 遺伝子から選択される核酸が挙げられ、本発明においては、外来遺伝子はベクターに組み込まれていてもよい。

ベクターとしては、例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター等が 挙げられる。

本発明によれば、常法に従って穿孔法によって外来遺伝子を導入した標的細胞を、細胞接着活性物質の存在下で培養することにより、該遺伝子が導入された形質転換細胞を効率よく得ることができる。細胞培養方法としては使用する細胞により、公知の方法から選択すれば良い。例えば細胞接着活性ポリペプチドの存在下で細胞培養を行う場合、培養液中に250~2000μg/mlの細胞接着活性ポリペプチドを含有させ、常法に従い培養すれば良い。

特に、細胞接着活性物質を被覆した培養器具を用いて培養するのが好ましい。培養器具とは、通常に細胞を培養する目的に使用する器具であれば良く、例えば、培養皿、マイクロキャリアー使用の培養器具、繊維状の中空糸使用の培養器具である。培養器具への該物質の被覆方法としては塗布しても良く、散布しても良い。例えば、細胞接着活性ポリペプチドの培養器具への被覆は容易に行うことができ、該ポリペプチドを例えばリン酸緩衝生理食塩水(PBS)のような適当な溶液に溶かし、培養器具に添加し、適当時間静置することで培養器具にポリペプチドを被覆できる。培養器具

に被覆するポリペプチド量としては50~1000pmo1/cm²の範囲、好適には150~600pmo1の範囲より選択すれば良い。

細胞接着活性物質の存在下で培養した形質転換細胞は培養物中より常法 により得ることができ、形質転換細胞を効率よく製造することができる。

得られた形質転換細胞は、細胞の遺伝子組換え技術を用いる有用物質の 生産、疾患モデルの開発、遺伝子治療等に有用であり、本発明により、効 率よく形質転換細胞が提供される。

また、細胞接着活性物質を含有するキットを使用することにより、本発明を簡便に行うことができる。キット中に含有される細胞接着活性物質は溶液でも良く、凍結乾燥品でも良い。キット中には細胞接着活性物質の溶解、希釈用緩衝液、細胞培養培地、細胞培養器具等を含有させても良い。例えば本発明の方法に用いるポリペプチド類、ポリペプチド希釈用PBS、培養器具等をまとめてキットとしておくことにより、簡便に、形質転換細胞の製造を行うことができる。キットに含める試薬は、溶液状でも凍結乾燥物でもよい。

なお、本発明で使用する穿孔法としての、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法等は、目的に応じて適宜選択、使用できる。

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

実施例1.

1. 細胞接着活性ポリペプチドの培養皿への塗布

配列表の配列番号3で表されるポリペプチド(以下C274と称す)、 配列表の配列番号4で表されるポリペプチド(以下H296と称す)およ び配列表の配列番号5で表されるポリペプチド(以下C・CS1と称す) をそれぞれ 1μ Mとなるようにリン酸級衝生理食塩水 (PBS) に溶かし、 0.22μ mのフィルター (マイレクスーGV、ミリポア社) を用いて滅 菌した。

これらの溶液をそれぞれ 24 穴のポリスチレン製培養皿(コーニング社製)に 1m1 / ウエルとなるように添加し、4 $\mathbb C$ 、一晩コートした。この培養皿は、以下に記載の形質転換細胞を添加する前に、ウシ胎児血清を含まないダルベッコ改変最少基本培地 $500\mu1$ / ウエルでリンスした。

2. 細胞の形質転換

10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変最少基本培地で培養したヒト 類表皮癌A-431細胞の培養皿(直径100mm)2枚分をそれぞれ1 0 m l のウシ胎児血清を含まないダルペッコ改変最少基本培地でリンスし た後、0.25%ウシ・トリプシンと0.02%EDTAを含むPBSを 3ml添加して細胞を培養皿よりはがした。これらに、それぞれ7mlの ウシ胎児血清を含まないダルベッコ改変最少基本培地を加えた後、800 rpm、3分遠心して細胞を集めた。得られた細胞を10mlのウシ胎児 血清を含むダルベッコ改変最少基本培地に懸濁し800rpm、3分遠心 して細胞を集めた。得られた細胞を合せて、10mlのPBSに懸濁し、 その10分の3量を取り、二分した後、それぞれを800rpm、3分遺 心して細胞を集めた。得られた細胞を再度、10mlのPBSに懸濁し、 800 r p m、3分遠心して細胞を集めた。得られた細胞の一方は、無菌 的に調製されたpCAT-コントロール (control)ベクター (プロメガ社) 15μgを含む1mlのPBSに懸濁した後、ジーンパルサー (パイオラッ ド社) 用のエレクトロポレーションキュベットに入れ、氷中で10分放置 した。もう一方の細胞は、1mlのPBSに懸濁した後、ジーンパルサー (バイオラッド社) 用のエレクトロポレーションキュベットに入れ、氷中

で10分放置した。それぞれの細胞は、氷中10分放置後、250V、960 μ Fで電圧を印加した。印加後、細胞をキュベットのまま氷中で10分放置した。この後、15m1の10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変最少基本培地中へ細胞を回収し、上記のポリペプチドをコートした24次のポリスチレン製培養皿に1m1/ウエルとなるように添加した。これらの細胞を5%炭酸ガス存在下、37 $^{\circ}$ で一晩培養した後、培地をアスピレーションで除去し、新たに10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変最少基本培地を1m1/ウエルとなるように加え、5%炭酸ガス存在下、37 $^{\circ}$ で一晩培養した。

3. 形質転換効率(遺伝子導入効率)の測定

培養した細胞は、1ウエル当り1.25mlのPBSで3回リンスし、CAT-ELISAキット(ベーリンガー・マンハイム社製)を用い、本キットの使用方法に従い、細胞溶解液を調製し発現CATの検出を行った。本キットは、西洋ワサビのベルオキシダーゼ標識の2次抗体と基質としてABTSを用いているので405nm/490nmを測定し、エレクトロポレーションの際、pCAT-コントロールベクターを添加しなかったものをブランクとして用い、各区のpCAT-コントロールベクターを添加したものの値からブランク値を引いた値を発現CAT量とした。

この結果を図1に示す。すなわち、図1は各ポリペプチド処理区での細胞への遺伝子導入効率を示す図であり、縦軸に無処理区、各ポリペプチド処理区が示され、横軸は405nmの吸光度と490nmの吸光度比で遺伝子導入効率が示されている。

図1に示すように、上記C274、H296、C・CS1処理区では無処理の培養皿に比べて発現CAT量は高く、pCATーコントロールベクターの細胞への導入効率が高いことが示された。

実施例2

1. 細胞接着活性ポリペプチドの培養皿への塗布

2. 細胞の形質転換

10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変最少基本培地で培養したアフリカミドリザル腎COS-7細胞の培養皿(直径100mm)2枚分をそれぞれ10mlのウシ胎児血清を含まないダルベッコ改変最少基本培地でリンスした後、0.25%ウシ・トリプシンと0.02%EDTAを含むPBSを3ml添加して細胞を培養皿よりはがした。これらに、それぞれ7mlのウシ胎児血清を含まないダルベッコ改変最少基本培地を加えた後、800rpm、3分遠心して細胞を集めた。得られた細胞を10mlのウシ胎児血清を含むダルベッコ改変最少基本培地に懸濁し800rpm、3分遠心して細胞を集めた。得られた細胞を10mlのウシ胎児血清を含むダルベッコ改変最少甚本培地に懸濁し800rpm、3分遠心して細胞を集めた。得られた細胞を合せて、12mlのPBSに懸濁し、その6分の5量を取り、二分した後、それぞれを800rpm、3分遠心して細胞を集めた。得られた細胞を、6mlのPBSに懸濁し、800rpm、3分遠心して細胞を集めた。得られた細胞の一方は、無菌的に調製されたpCAT-コントロール (control)ベクター (プロメガ社)

15μgを含む1mlのPBSに懸濁した後、ジーンパルサー(バイオラッド社)用のエレクトロポレーションキュベットに入れ、水中で10分放置した。もう一方の細胞は、1mlのPBSに懸濁した後、ジーンパルサー(バイオラッド社)用のエレクトロポレーションキュベットに入れ、水中で10分放置した。それぞれの細胞は、氷中10分放置後、250V、960μFで電圧を印加した。印加後、細胞をキュベットのまま氷中で10分放置した。この後、15mlの10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変最少基本培地中へ細胞を回収し、上記のポリペプチドをコートした24穴のポリスチレン製培養皿に1ml/ウエルとなるように添加した。これらの細胞を5%炭酸ガス存在下、37℃で一晩培養した後、培地をアスピレーションで除去し、新たに10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変最少基本培地を1ml/ウエルとなるように加え、5%炭酸ガス存在下、37℃で一晩培養した。

3. 形質転換効率(遺伝子導入効率)の測定

培養した細胞は、1ウエル当り1.25mlのPBSで3回リンスし、CAT-ELISAキット(ベーリンガー・マンハイム社製)を用い、本キットの使用方法に従い、細胞溶解液を調製し発現CATの検出を行った。本キットは、西洋ワサビのペルオキシダーゼ標識の2次抗体と基質としてABTSを用いているので405nm/490nmを測定し、エレクトロポレーションの際、pCAT-コントロールベクターを添加しなかったものをブランクとして用い、各区のpCAT-コントロールベクターを添加したものの値からブランク値を引いた値を発現CAT量とした。この結果を図2に示す。すなわち、図2は各ポリペプチド処理区での細胞への遺伝子導入効率を示す図であり、縦軸に無処理区、各ポリペプチド処理区が示され、横軸は405nmの吸光度と490nmの吸光度比で遺伝子導入効

率が示されている。

図2に示すように、上記C274、H296、C・CS1処理区では無処理の培養皿に比べて発現CAT量は高く、pCATーコントロールベクターの細胞への導入効率が高いことが示された。

実施例3

キットの作製

下記表2に示すようにC274、H296、 $C\cdot CS1$ 、PBSおよび 培養皿で遺伝子導入細胞製造用キットを作製した。このうち、試薬A、B、Cはそれぞれ上記のボリペプチドをPBSにて表に示す濃度としたものを 調製した。その他は、実施例1に記載のものを使用した。なお、表2に示すキットの試薬<math>A、B、Cおよび試薬希釈液は、いずれも<math>0. $22\mu m$ の 滅菌フィルターで予めろ過したものを用いて、無菌的に調製した。

表 2

形質転換細胞製造用キット

試薬A···100 µM C274	150μ1
試薬B···100 µM H296	150μ1
試薬C···100 µM C·CS1	150μ1
試薬希釈液・・・PBS	45 m l
24穴ポリスチレン製培養皿	3枚

以上記載したごとく、本発明によれば、細胞への遺伝子導入を目的とする従来法の問題点を解決し、標的細胞への外来遺伝子導入効率を向上させた形質転換細胞製造方法が提供できる。また、該方法に使用する形質転換細胞製造用のキットも提供することができる。

図面の簡単な説明

図1は、ヒト類表皮癌A-431細胞へのpCAT-コントロールベクターの導入における細胞接着活性ポリペプチド処理の遺伝子導入効率に対する効果を示すグラフである。

図2は、アフリカミドリザル腎COS-7細胞へのpCAT-コントロールベクターの導入における細胞接着活性ポリペプチド処理の遺伝子導入効率に対する効果を示すグラフである。

配列番号:1

配列の長さ:4

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプテド

配列:

Arg Gly Asp Ser

1

配列番号:2

配列の長さ:25

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

1

配列の種類:ペプチド

配列:

Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr Leu Pro His Pro Asn Leu His

5

10

15

Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr

20

25

配列番号:3

配列の長さ:274

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプテド

Pro	Thr	Asp	Leu	Arg	Phe	Thr	Asn	i l e	Gly	Pro	Asp	Thr	Met	ATZ
1				5			•		10		•			15
Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	ile	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu
			-	20					25					30
Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	G I u-	G1u.	Asp	Val	Ala	Glu	Leu
				35					40					45
Ser	He	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Va 1	Vai	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
				50					55					60
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gln
		•		65					70					75
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	λrg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
			•	80					85					90
Ser	Pro	Thr	Gly	He	Asp	Phe	Ser	Asp	lle	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
		•	•	95					100					105
Thr	Val	His	Trp	ile	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	l le	Thr	Gly	Tyr	Arg
				110					115					120
11e	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp
				1.25					130					135
Arg	y Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	. Ser	lle	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr
				140			•		145					150
Pro	Gly	The	Glu	ı Tyr	Val	i Val	Ser	lle	. Val	Ala	Leu	. Asn	Gly	Arg

Glu Glu Ser Pro Leu Leu lie Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp 180 175 170 Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu 195 190 185 Leu lie Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg 210 205 200 lle Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe 225 220 215 Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys 240 235 230 Pro Gly Val Asp Tyr Thr lle Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg 255 250 245 Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro 11e Ser 11e Asn Tyr Arg 270 265 260

Thr Glu Ile Asp

配列番号:4

配列の長さ:296

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプテド

配列:

Ala lle Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe Thr Gin Val Thr Pro

5 10 15

1	hr	Ser	Leu	Ser	Ala	Gln	Trp	Thr	Pro	Pro	Asn	Val	Gin	Leu	Thr
					20					25					30 .
(Sly	Tyr	Arg	Val	Arg	Val	Thr	Pro	Lys	Glu	Lys	Thr	Gly	Pro	Met
					35					40					45
į	Lys	Glu	lle	Asn	Leu	Ala	Pro	Asp	Ser	Ser	Ser	Val	Val	Val	Ser
					50					55					60
	Gly	Leu	Met	Val	Ala	Thr	Lys	Tyr	Glu	Va I	Ser	Val	Tyr	Ala	Leu
					65					70	<i>;</i>			•	75
	Lys	Asp	Thr	Leu	Thr	Ser	Arg	Pro	Ala	Gin	Gly	Val	Val	Thr	Thr
		٠			80					85					90
	Leu	Glu	Asn	Val	Ser	Pro	Pro	Arg	Arg	Ala	Arg	Val	Thr	Asp	Ala
					95					100	•				105
	Thr	Glu	Thr	Thr	lle	Thr	lle	Ser	Trp	Arg	Thr	Lys	Thr	Glu	Thr
					110					115			-		120
	He	Thr	Gly	Phe	Gln	Val	Asp	Ala	Val	Pro	Ala	Asn	Gly	Gin	Thr
					125	i				130		•			135
	Pro	He	Gln	Arg	Thr	lle	Lys	Pro	qzk e	Val	Arg	Ser	Tyr	Thr	lle
					140)			٠	145					150
	Thr	Gly	Lei	Gln	Pro	Gly	Thr	Asp	Tyr	Lys	lle	Tyŗ	Leu	Tyr	Thr
			<i>.</i>		155	5				160					165
	Leu	ı Ası	n Ass) Asn	Ala	a Ara	S Sei	r Sei	Pro	Val	Val	l e	Asp	Ala	Ser
					170)		·		175					180
	Thi	r Ala	a Il	e Ass	'Ala	e Pro	o Se	r Ası	n Leu	ı Arg	Phe	Leu	Ala	Thr	
			· ·		18	5				190)				195

Asn	Ser	Leu	Leu	Val	Ser	Trp	Gin	Pro	Pro	Arg	Ala	Arz	lle
			200					205					210
Gly	Tyr	He	lle	Lys	Tyr	Glu	Lys	Pro	Gly	Ser	Pro	Pro	Arg
			215					220					225
Val	Val	Pro	Arg	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Thr	Glu	Ala	Thr	l·l e
			230										240
Gly	Leu	Glu	Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Thr	lle	Tyr	Val	He	Ala
													255
ı Lys	s Ası	n Asn	Gln	Lys	Ser	Gli	Pro	Leu	116	Ġly	/ Arg	Lys	Lys
													270
r As	p Gl	u Lei	ı Pro	Gli	n Lei	y Va	l The	r Lei	u Pri	Hi	s Pro	a Asr	Leu
	•												285
s Gl	y Pr	o Gi	u II	e Le	u As	p Va	l Pr	o Se	r Th	r			
	Gly Val Gly	Gly Tyr Val Val Gly Let	Gly Tyr Ile Val Val Pro Gly Leu Glu Lys Asn Asn r Asp Glu Leu	Gly Tyr Ile lle 215 Val Val Pro Arg 230 Gly Leu Glu Pro 245 Lys Asn Asn Gln 260 r Asp Glu Leu Pro 279 s Gly Pro Glu II	Gly Tyr lie lie Lys 215 Val Val Pro Arg Pro 230 Gly Leu Glu Pro Gly 245 Lys Asn Asn Gln Lys 260 r Asp Glu Leu Pro Gli 275 s Gly Pro Glu lie Le	Gly Tyr I ie lie Lys Tyr 215 Val Val Pro Arg Pro Arg 230 Gly Leu Glu Pro Gly Thr 245 Lys Asn Asn Gln Lys Ser 260 r Asp Glu Leu Pro Gln Leu 275 s Gly Pro Glu I ie Leu As	Gly Tyr Ile lie Lys Tyr Glu 215 Val Val Pro Arg Pro Arg Pro 230 Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu 245 Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu 260 r Asp Glu Leu Pro Gln Leu Va 275 s Gly Pro Glu Ile Leu Asp Va	Gly Tyr lie lie Lys Tyr Glu Lys 215 Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly 230 Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr 245 Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro 260 r Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val The 275 s Gly Pro Glu lie Leu Asp Val Pr	Gly Tyr Ile lie Lys Tyr Glu Lys Pro 215 220 Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val 230 235 Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr 245 250 Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu 260 265 r Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr Leu 275 286 s Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro Se	Gly Tyr lie lie Lys Tyr Glu Lys Pro Gly 215 220 Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr 230 235 Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr lie 245 250 Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu lie 260 265 r Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr Leu Pro 275 280 s Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Th	Gly Tyr lie lie Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser 215 220 Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu 230 235 Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr lie Tyr 245 250 Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu lie Gly 260 265 r Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr Leu Pro His 275 280 s Gly Pro Glu lie Leu Asp Val Pro Ser Thr	Gly Tyr lie lie Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro 215 220 Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala 230 235 Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr lie Tyr Val 245 250 Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu lie Gly Arg 260 265 r Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr Leu Pro His Pro 275 280 s Gly Pro Glu lie Leu Asp Val Pro Ser Thr	Gly Tyr lie lie Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro 215 220 Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr 230 235 Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr lie Tyr Val lie 245 250 Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu lie Gly Arg Lys 260 265 r Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr Leu Pro His Pro Asr 275 280 s Gly Pro Glu lie Leu Asp Val Pro Ser Thr

한 제 중 등 : 5

配列の長さ:302

配列の型:アミノ酸

鎖の数: 1 本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプテド

配列:

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn lle Gly Pro Asp Thr Met Arg

1 5 10 15

Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	He	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu
				20		•			25					30
Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	Val	Ala	Glu	Leu
				35					40					45
Ser	lle	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Val	۷a İ٠	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
•				50					55					60
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gln
		٠		65			·		. 70	· · .				75
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
	•			80					85					90
Ser	Pro	Thr	Gly	lle	Asp	Phe	Ser	Asp	lle	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
				95					100					105
Thr	Val	His	Trp	lle	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	lle	Thr	Gly	Tyr	Arg
				110		-			115					120
lle	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp
				125					130	·	·			135
Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	nzk.	Ser	lle	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr
	•			140					145					150
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	۷al	Ser	lle	Val	Ala	Leu	nzk	Gly	Arg
			•	155					160					165
Gli	Gli	ı Sei	Pro	Leu	Leu	lle	Gly	Gln	Gln	Ser	Thr	Val	Ser	Asp
				170					175	•				180
. Va	l Pro	o Ar	g Asp	Leu	ĢŪ	ı Val	Val	Ala	. Ala	rhT i	Pro	Thi	Ser	Lev
				185	5				190)				19

Leu lle Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg 210 205 200 lle Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe 225 220 215 Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys 240 235 230 Pro Gly Val Asp Tyr Thr lie Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg 255 250 245 Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro 11e Ser 11e Asn Tyr Arg 270 265 260 Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Asp Glu Leu Pro Gin Leu Val Thr 285 280 275 Leu Pro His Pro Asn Leu His Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro 300 295 290

Ser Thr

配列番号:6

配列の長さ:5

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

配列:

Tyr lle Gly Ser Arg

1

5

配列番号:7

配列の長さ:283

配列の型:アミノ酸

鎖の数: | 本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類:ペプテド

Ala	Val	Pro	Pro	Pro	Thr	Asp	Leu	Arg	Phe	Thr	Ásn	lle	Glý	Pro-
• 1				5					10		,			15
Asp	Thr	le t	Arg	Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	lie	Asp	Leu
				20					25					30
Thr	Asn	Phe	Leu	Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp
				35					40		. •			45
Val	Ala	Glu	Leu	Ser	lle	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Val	Val	Leu
				50	•				55					60
Thr	Asn	Leu	Leu	Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser
		٠.		65		•			70					75
Val	Tyr	Glu	Gln	His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys
				80				•	85					90
Thr	Gly	Leu	Asp	Ser	Pro	Thr	Gly	ile	Asp	Phe	Ser	Asp	lle	Thr
				95					100	l				105
Ala	. Asn	Ser	Phe	Thr	Val	His	Trp	lle	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	lle
				110			•		115	5				120
Th	r Gly	r Tyr	r Arg	lle	. Arg	His	His	Pro	Glu	His	s Phe	Sei	Gly	Arg
		•		125	5			٠.	130)				135

Pro	Arg	Glu	Asp	Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	lle	Thr	Leu
				140					145					150
Thr	Asn	Leu	Thr	Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	lle	Val	Ala
				155					150					165
Leu	Asn	Gly	Arg	Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	lle	Gly	Gin	Gln	Ser
				170					175					180
Thr	Val	Ser	Asp	Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Giu	Val	Val	Ala	Ala	Thr
				185					190					195
Pro	Thr	Ser	Leu	Leu	lle	Ser	Trp	Asp	Ala	Pro	Ala	Val	Thr	Val
				200		•			205					210
Àrg	Tyr	Tyr	r Arg	lle	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro
	•			215					220					225
Val	Gli	n Glo	u Phe	. The	· Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	lle
				230					235					240
Se	r Gl	y Le	u Ly:	s Pr	o Gly	y Val	l Ası	Туг	Thr	116	2 Thr	Val	Tyr	Ala
				24					250					255
۷a	1 Th	r Gi	y Ar	•		p Sei	r Pr	o Ala	a Ser	Se	r Lys	s Pro	ile	e Ser
				26										270
11	e As	n Ty	ır Ar	g Th	r Gl	u II	e As	p Ly	s Pro	o Se	r Gli	n Ne	t	
				27					28					

配列番号:8

配列の長さ:279

配列の型:アミノ酸

鎖の数: | 本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプテド

•											•				
Pro	Thr	Asp	Leu	Arg	Phe	Thr	Asn	He	Gly	Pro	Asp	Thr	Met	Arg	
1			-	5				· ·	10			·		15	
Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	lle	λsp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu	
	٠			20.	•		٠.		25	•				30	
Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu.	Glu	Asp	Val	Ala	Glu	Leu	
÷			•	35					40				•	45	
Ser	lle	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Аlа	Val	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu	
				50			•		55					60	
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gin	
		٠		65					70					75	
His	Glu	Sei	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gin	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp.	
				80					85					90	
Sei	Pro	The	r Gly	ile	γsρ	Phe	Ser	Asp	ile	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe	
				95					100					105	
Th	r Va	l Hi	s Tri	lle	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	lle	Thr	Gly	Tyr	Arg	
			•	110					115					120	
11:	e Ar	g Hi	s Hi	s Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp	
				125	5				130		-			135	
Ar	g Va	i. Pr	o Hi	s Se	Arg	nzk g	Ser	lle	Thr	Leu	Thr	. Yzı	Lei	Thr	
				140)				145	;	•			150	
Pr	o Cl	y Ţ'n	r Gl	u Ty	r Va	l Val	Sei	rile	. Val	Ala	Lei	ızkı	Gly	Arg	
				15	5				160) _				165	

WO 96/17073

Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	lle	Gly	Gln	Gln	Ser	Thr	Val	Ser	Asp
				170		٠			175					180
Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu
	•			185					190					195
l.es	ile	Ser	Trp		Ala	Pro	Ala	Val	Thr	Val	Arg	Tyr	Tyr	Arg
200				200					205					210
116	Thr	· Tvr	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro	Val	Gln	Glu	Phe
				215					220					225
The	r Va	ı Pro	o Glis			Ser	Thi	r Ala	The	· Ile	e Ser	Gly	Leu	Lys
• • • •			•	230					235					240
Pr	n Gl	v Va	l Ası			- []6	e Thi	r Val	l Ty	Ala	a Val	Thr	Gly	Arg
• •		,		24					250					255
C I	v 1 s	n Se	r Pr			r Se	r Ly	s Pr	0 11	e Se	r II	e Ası	n Ty	Arg
U	y no	, p - 0 c		26					26	_				270
ጥነ	C	1 n - 1 1	le As			o Se	r G1	n Me	Ł					
1.1	ii U		i Cino	27										
					_									

配列番号:9

配列の長さ:474

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプテド

Ala	Val	Pro	Pro	Pro	Thr	Asp	Leu	Arg	Phe	Thr	Asn	lle	Gly	Pro
1				5					10					15
Asp	Thr	Met	Arg	Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro.	Pro	Ser	lle	Asp	Leu
				20			· .		25					30
Thr	Asn	Phe	Leu	Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	G l u	Asp
				35	,	,			40		·			45
Val	Ala	Glu	Leu	Ser	He	Ser	Pro	Ser	ASP	Asn	Ala	Val	Val	Leu
				50					55	•			•	60
Thr	Asn	Leu	Leu	Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Vai	Ser	Ser
•		•	•	65					70					75
Val	Tyr	Glu	Gln	His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gin	Lys
				. 80					85					90
Thr	Gly	Leu	Asp	Ser	Pro	Thr	Gly	lle	Asp	Phe	Ser	Asp	lle	Thr
				95	,				100					105
λla	. Asn	Ser	Phe	Thr	Val	His	Trp	ile	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	lle
				110					115					120
The	Gly	/ Туг	Arg	3 · Ile	λrg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg
				125					130					135
Pro) Arg	g Gli	ızk i) Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Λsn	Ser	ile	Thr	
				140					145					150
Th	r Ası	n Lei	u Th	r Pro	Gly	Thr	r Glu	ı Tyr			Ser	lle	Val	
				155					160					165
Le	u Ası	n Gl	y Ar			ı Sei	r Pro	o Leu	Lei	ı lle	Gly	Gln	G1n	
				170)				175	5				180

hr Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Th	r
185 190	
Pro Thr Ser Leu Leu lie Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Va	. 1
200 205 21	
Arg Tyr Tyr Arg lie Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pr	0
215 220 22	
Val Gin Giu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr II	le
	40
Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr lle Thr Val Tyr A	la
	55
Val Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile S	er
	270
lle Asn Tyr Arg Thr Glu lle Asp Lys Pro Ser Gln Asn Glu G	lly
	285
Leu Asn Gln Pro Thr Asp Asp Ser Cys Phe Asp Pro Tyr Thr \	Val
	300
Ser His Tyr Ala Val Gly Asp Glu Trp Glu Arg Met Ser Glu	Ser
	315
Gly Phe Lys Leu Leu Cys Gin Cys Leu Gly Phe Gly Ser Gly	His
320 325	330
Phe Arg Cys Asp Ser Ser Arg Trp Cys His Asp Asn Gly Val	Asn
335 340	345
Tyr Lys lle Gly Glu Lys Trp Asp Arg Gln Gly Glu Asn Gly	Gin
350 355	360

Met	Met	Ser	Cys	Thr	Cys	Leu	Gly	Asn	Gly	Lys	Gly	Gl[u]	Phe	Lys
-				365				•	370					375
Cys	Asp	Pro	His	Glu	Ala	Thr	Cys	Tyr	Asp	Asp	Gly	Lys	Thr	Tyr
				380					385					390
His	Va I	Gly	Glu	Gln	Trp	Gln	Lys	Glu	Tyr	Leu	Gly	Ala	lle-	Cys
		.·		395					400		•			405
Ser	Cys	Thr	Cys	Phe	Gly	Gly	Gln	Arg	Gly	Trp	Arg	Cys.	Asp	Asn
				410					415					420
Cys	Arg	Arg	Pro	·G į y	Gly	Glu	Pro	Ser	Pro	Glu	Gly	Thr	Thr	Gly
•	•			425					430					435
Gin	Ser	Tyr	Asn	Gln	Tyr	Ser	Gln	Ärg	Tyr	His	GIn	Arg	Thr	Asn
				440					445					450
Thr	Asn	Val	Asn	Cys	Pro	lle	Glu	Cys	Phe	Met	Pro	Leu	Asp	Val
				455					460					465
Gln	Ala	Åsp	Arg	Glu	Asp	Ser	Arg	Glu						
				470										

配列番号:10

配列の長さ:385

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

la	Pro	He	Val	Asn	Lys	Val	Val	Thr	Pro	Leu	Ser	Pro	Pro	Thr
1				5		٠			10					15
lsn	Leu	His	Leu	Glu	Ala	Asn	Pro	Asp	Thr	Gly	Val	Leu	Thr	Val
	•			20					25					30
Ser	Trp	Glu	λrg	Ser	Thr	Thr	Pro	Asp	lle	Thr	Gly	Tyr	Arg	ile
				35					40					45
Thr	Thr	Thr	Pro	Thr	Asn	Gly	Gin	Gln	Gly	Asn	Ser	Leu	Glu	Glu
				50	}				55					60
Va!	Vai	His	s Ala	a Asp	Gin	Ser	Ser	Cys	Thr	Phe	Asp	Asn	Leu	Ser
				65	5				70					75
Pro	Gly	l Le	u Gl	u Ty	r Asn	Val	Ser	Val	Tyr	Thr	Val	Lys	Asp	Asp
				8	0				85	,				90
Lys	Gl	u Se	r Va	l Pr	o Ile	Ser	Asp	Thr	116	116	Pro	Ala	Vai	Pro
				9	5				100)				105
Pro	Pr	o Th	r As	p Le	u Ar	g Phe	e Thr	Asn	110	e Gi	y Pro	Asp	Thr	Met
				. 11	0				113	5				120
Arg	g Va	1 Th	r Tr	ro Al	a Pr	o Pr	o Pro	se Se	r II	e As	p Le	u Thr	· Asn	Phe
				12	25			·	13	0				135
Le	u Ya	ıl Aı	rg T	yr Se	er Pr	o Va	1 Ly	s As	n Gl	u Gi	zk u	p Val	l Ala	a Glu
				14	10				14	5				150
Le	u S	er l	le S	er P	ro Se	r As	p As	n Al	a Va	l Va	i Le	u Th	r As	n Leu
				1	55				16	0				165
Le	u P	ro G	ly T	hr C	lu Ty	yr Va	ıl Ya	ıl Se	r Va	al Se	er Se	er Va	1 Ty	r Glu
				1	70				1	75				180

G1n	His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gin	Lys	Thr	Gly	Leu		٠
			•	185		· .	•		190					195		
Asp	Ser	Pro	Thr	G I.y.	He	Asp	Phe	Ser	Asp	He	Thr	Ala	Asn	Ser		
•				200				÷ ·	205					210		
Phe	Thr	Val	His	Trp	lle	Ala	Pro	Årg	Ala	Thr	lle	Thr	G l'y	Tyr		
				215	٠.				220		•			225		
Arg	lle	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arz	Pro	Arg	Glu		,
			·	230					235				٠	240	•	
Asp	Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	٠.		Leu	Thr	Asn			
			•	245					250		٠.			255		
Thr	Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Vaĺ	Ser		Val	Ala	Leu	Asn			
				260					265					270		
Arg	Glu	Glu			Leu	Leu	lle	Gly			Ser	Thr	Val		. '	
		••		275				•	280					285		
Asp	Val	Pro	Arz	Asp	Leu	Glu	Val	Val		Ala	Thr	Pro	Thr		:	
				290			-	*	295					300		
Leu	Leu	lle	Ser	Trp	Asp	Ala	Pro	Ala		Thr	Val	Arg	Tyr	•	. '	
· .				305					310					315	•	
Arg	lle	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly		Ser	Pro	Val	Gla			
				320			·		325					330		
Phe	Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	lle	Ser	Gly	Leu		
				335				٠.	340					345	,	
Lys	Pro	Gly	Val	Asp	Tyr	Thr	lle	Thr			Ala	Val	Thr	•		
-				350					355				•	360		
		•														
							•	•						•		

Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro 11e Ser 11e Asn Tyr

365 370

Arg Thr Glu 11e Asp Lys Pro Ser Gln Met

380 385

配列番号:11

配列の長さ:549

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

配列:

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg 15 5 10 Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu 30 25 20 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu Ser lie Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu 60 55 50 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln 75 70 65 His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp 90 85 80

Ser	Pro	Thr	Gly	lle	Asp	Phe	Ser	ASP	lle	Thr	Ala	ASD	Ser	rne
				95				•	100					105
Thr	Val	His	Trp	He	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	lle	Thr	Gly	Tyr	Arg
				110					115				•	120
lle	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp
				125			•		130					135
Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	lle	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr
				140	٠		•		. 145					150
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Vai	Val	Ser	ile	Val	Ala	Leu	Asn	Gly	Arg
				155					160					165
Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	ile	Gly	Gln	Gin	Ser	Thr	Val	Ser	Asp
	٠.			170			,		175		•	•		180
Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	V.a I	Val	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu
				185					190			. •	. •	195
Leu	lle	Ser	Trp	Asp	Ala	Pro	Ala	Val	Thr	Val	Arg	Tyr	Tyr	Arg
				200					205					210
I l e	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	[G [y	Gly	Asn	Ser	Pro	Val	Gin	Glu	Phe
•	·			215					220					225
Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Аlа	Thr	lle	Ser	Gly	Leu	Lys
				230			•		235					240
Pro	Gly	Val	Asp	Tyr	Thr	lle	Thr	Va!	Tyr	Ala	Val	Thr	Gly	Arg
			٠	245			·		250					255
. Cly	λsp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ser	Lys	Pro	lle	Ser	lle	Asn	Tyr	Arg
				260					265					270

Thr Glu lie Asp Lys Pro Ser Met Ala lie Pro Ala Pro Thr Asp
275 280 285
Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp
290 295 300
Thr Pro Pro Asn Val Gin Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr
305 310 315
Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu lie Asn Leu Ala Pro
320 325 330
Asp Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys
335 340 345
Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg
350 355 360
Pro Ala Gin Giy Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro
365 370 375
Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile
380 385 390
Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr 11e Thr Gly Phe Gin Val Asp
395 400 405
Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro lle Gln Arg Thr lle Lys
410 415 420
Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr lle Thr Gly Leu Gin Pro Gly Thr
425 430 435
Asp Tyr Lys lle Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser
440 445 450

Ser	Pro	Val	Val	lle	Y2b	Ala	Ser	Thr	Ala	lle	ASP	Ala	rro	Ser
				455		÷			460					465
Asn	Leu	Arg	Phe	Leu	Ala	Thr	Thr	Pro	λsn	Ser	Leu	Leu	Va l	Ser
				470					475				٠.	480
Trp	Gin	Pro	Pro	Arg	Ala	Arg	lle	Thr	Gly	Tyr	lle	lle	Lys	Tyr
				485					490					495
Glu	Lys	Pro	Gly	Ser	Pro	Pro	Arg	Clu	Val	Val	Pro	Arg	Pro	Arg
				50.0	·				505					510
Pro	Gly	Val	Thr	Glu	Ala	Thr	lle	Thr	Gly	Leu	Glu	Pro	Gly	Thr
			•	515					520	•	·			525
Glu	Tyr	Thr	lle	Tyr	Val	lle	Ala	Leu	Lys	Asn	Asn	Gln	Lys	Ser
				530					535					540
Glu	Pro	Leu	lle	Gly	Arg	Lys	Lys	Thr				•		
				545										

配列番号:12

配列の長さ:422

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプテド

配列:

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg

1 5 10 15

Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser lle Asp Leu Thr Asn Phe Leu
20 25 30
al Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu
35 40 45
Ser lle Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu
50 55 60
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln
65 70 75
His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp
80 85 90
Ser Pro Thr Gly lie Asp Phe Ser Asp lie Thr Ala Asn Ser Phe
95 100 105
Thr Val His Trp lie Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg
110 115 120
lle Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp
125 130 135
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser lle Thr Leu Thr Asn Leu Thr
140 145 150
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser lie Val Ala Leu Asn Gly Arg
155 160 165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu lle Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp
170 175 180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu
185 190 195

	Leu	lle	Ser	Trp	Asp	Ala	Pro	Ala	Val	Thr	Val	Arg	Tyr	Tyr	Arg			
					200	•				205					210	•		
	He	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Åsn	Ser	Pro	Val	Gln	Glu	Phe			
					215			·.	•	220					225			•
*	Thr	Val	Pro			Lvs	Ser	Thr	Ala		l le	Ser	Glv	Leu		·		
					230			• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •		235			.,		240			
	D	C I	Val			Th-		ጥሎ -				Val	The	Clv			. '	
	PFO	u i y	741	42 h	•		116	1111	441		Ald		1111	Gly				
		_		_	245					250				•	255	,		
	Gly	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ser	Lys	Pro	lle	Ser	ile	ASD	Tyr				
	٠.				260					265		•			270			
	Thr	Glu	He	Asp	Lys	Pro	Ser	Met	Ala	Asn	Glu	Gly	Leu	Asn	Gln			,
					275					280			٠.		285	•		
	Pro	Thr	Asp	Asp	Ser	Cys	Phe	Asp	Pro	Tyr	Thr	Val	Ser	His	Tyr			
					290					295					300			
	Ala	Val	Gly	Asp	Glu	Trp	Glu	Arg	Met	Ser	Glu	Ser	Gly	Phe	Lys			
					305	;				310					315			
	Lei	. Leu	Cys	Gln	Cys	Leu	Gly	Phe	Gly	Ser	Gly	His	Phe	Arg	Cys	•		
					320	. ·)				325					330		•	
	7 64	n Ser	Ser	Ars			s His	. Aso	Asn	Gly	Val	Asn	Tyr	Lys	lle			
	, no	, 001		6	335					340					345			,
	c i	C1.	. [Υ					, (:1.			. Gin	Met	Met			•	
	U I	y Git	i raz		•		5 011		, 010			. • • • • • • • • • • • • • • • • • • •			360			
					350				.	355			· · · · ·					
	Су	s Thi	r Cys	Le		•	n (Cl)	y Ly:	S 613			s ras	. Cys	2 W2h	Pro			
•					36	5				370	J				375	.•		
		••						•									•	
					-													
			•													•		

His Glu Ala Thr Cys Tyr Asp Asp Gly Lys Thr Tyr His Val Gly 390 385 380 Glu Gln Trp Gln Lys Glu Tyr Leu Gly Ala Ile Cys Ser Cys Thr 405 400 395 Cys Phe Gly Gly Gln Arg Gly Trp Arg Cys Asp Asn Cys Arg Arg 420 415 410 Pro Gly 配列番号:13 配列の長さ:332 配列の型:アミノ酸 鎖の数:1本鎖 トポロジー:直鎖状 配列の種類:ペプテド 配列: Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg 15 10 5 Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser lle Asp Leu Thr Asn Phe Leu 30 25 20 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu 45 40 35

50

65

Ser lle Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu

Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln

55

70

60

75

His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gin	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
		•		80					85					90
Ser	Pro	Thr	Gly	lle	Asp	Phe	Ser	Asp	He	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
	•			95					100				,	105
Thr	Val	His	Trp	lle	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	lle	Thr	Gly	Tyr	Arg
				110					115					120
He	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp
				125				-	130		· .			135
Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	lle	Thr	Leu	Thr	Åsn	Leu	Thr
				140				. •	145	٠.				150
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	V a 1	Ser	lle	Val	Ala	Leu	Asn	Gly	Arg
				155					160				•	165
Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	lle	Gly	Gln	Gln	Ser	Thr	Val	Ser	Asp
				170					175					180
Val	Pro	Arg	Asp	Leu	G-1 u	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu
		÷	٠	185					190					195
Leu	lle	Ser	Trp	Asp	Ala	Pro	Ala	Val	Thr	Val	Arg	Tyr	Tyr	Arg
				200				•	205					210
lle	Thr	Tyr	G 1 _. y	Glu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro	۷al	Gln	Glu	Phe
				215			٠.		220					225
Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	lle	Ser	Gly	Leu	Lys
				230					235					240
Pro	Gly	Val	Asp	Tyr	Thr	lle	Thr	Val	Tyr	Ala	Val	Thr	Gly	Arg
				245					250					255

Gly Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ser	Lys	Pro	He	Ser	lle	Asn	Tyr	Arg
			260					265					270
Thr Glu	ile	Asp	Lys	Pro	Ser	Met	Ala	Asn	Ser	Asp	Ser	Glu	Cys
			275					280					285
Pro Leu	Ser	His	Asp	Gly	Tyr	Cys	Leu	His	Asp	Gly	Val	Cys	Met
			290					295					300
Tyr ile	Glu	Ala	Leu	Asp	Lys	Tyr	Ala	Cys	Asn	Cys	Yal	Val	Gly
			305					310					315
Tyr II	e Gly	r. G11	ı Arg	Cys	Gin	Tyr	Arg	Asp	Leu	Lys	Trp	Trp	Glu
			320)				325	5				330

Leu Arg

配列番号:14

配列の長さ:341

配列の型:アミノ酸

鎖の数: 1 本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプテド

配列:

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn lle Gly Pro Asp Thr Met Arg

1 5 10 15

Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser lle Asp Leu Thr Asn Phe Leu

20 25 30

Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu

35 40 45

Ser	118	Ser	rro	ser	ASP	ΥSU	AIZ	vai	124	Leu	ınr	42 U	Leu	reu
			•	50		•			55					60
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Vai	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gln
				65					70					75
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
				80	•				85					90
Ser	Pro	Thr	Ģly	He	Asp	Phe	Ser	Asp	lle	Thr	Ala	nzk	Ser	Phe
				95	. ·				100					105
Thr	Val	His	Trp	lle	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	ile	Thr	Gly	Tyr	Arg
		,		110					115					120
lle	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp
				125					130		•		٠	135
Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	lle	Thr	Leu	Thr	nzk	Leu	Thr
				140					145					150
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	ile	Val	Ala	Leu	Asn	Gly	Arg
			•	155					160		•			165
Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	lle	Cly	Gin	Gin	Ser	Thr	Val	Ser	Asp
•				170	: .				175					180
V a l	Pro	Arg	Asp	Leu	Clu	Val	Val	Ala	Аlа	Thr	Pro	Thr	Ser	
				185	•			٠	190					195
Leu	11e	Sei	Trp	λsp	Ala	Pro	Ala	Vai	Thr	Val	Arg	Туг	Tyr	Arg
				200					205					210
lle	Thr	Ту	r Gly			Cly	Gly	Asn			Val	Gln	Glu	
٠				215	,				220)				225

Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	lle	Ser	Gly	Leu	Lys
				230					235					240
Pro	Gly	Val	λsp	Tyr	Thr	lle	Thr	Val	Tyr	Ala	Val	Thr	Gly	Arg
				245					250					255
Gly	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ser	Lys	Pro	lle	Ser	lle	nzk	Tyr	Arg
				260					255					270
Thr	Glu	lle	Asp	Lys	Pro	Ser	Met	Gly	lle	Tyr	lle	Ser	Gly	Met
				275					280					285
Ala	Pro	Arg	Pro	Ser	Leu	Thr	Lys	Lys	Gin	Arg	Phe	Arg	His	Arg
				290					295					300
Asn	Arg	Lys	Gly	Tyr	Arg	Ser	Gln	Arg	Gly	His	Ser	Arg	Gly	Arg
				305					310					315
Ásn	Gln	Asn	Ser	Arg	Arg	Pro	Ser	Arg	Ala	Met	Trp	Leu	Ser	Leu
				320					325					330
Phe	Ser	Ser	Lys	Asn	Ser	Ser	Ser	Val	Pro	λla				
				335	•				340					

配列番号:15

配列の長さ:446

記列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプテド

配列:

Pro	Thr	Asp	Leu	Arg	Phe	Thr	Asn	lle	Gly	Pro	Asp	Thr	Met	Arg
.1				5					10					15
Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	lle	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu
				20					25					30
Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	Va!	Ala	Glu	Leu
•				35			٠.		40			·	,	45
Ser.	lle	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Va I	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
				50	. ·				55				٠	60
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gln
				65			٠.		70					75
His	Gľu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
				80					85					90
Ser	Pro	Thr	Gly	lle	Asp	Phe	Ser	Asp	lle	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
			•	95				•	100		•			105
Thr	Val	His	Trp	He	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	lle	Thr	Gly	Tyr	Arg
			•	110					115					120
lle	Àrg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	λrg	Pro	Arg	Glu	qzk
				125			·	٠	130					135
y 1.3	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	lle	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr
			٠	140					145					150
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Ya l	Val	Ser	ile	Val	Ala	Leu	A s n	Gly	Arg
				155					160					155
Glu	Gļu	Ser	Pro	Leu	Leu	ile	Gly	Gln	Gln	Ser	Thr	Val	Ser	Asp
				170					175					180

Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser	Leu
185 190	195
Leu lle Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr	Arg
200 205	210
lle Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu	Phe
215 220	225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr lle Ser Gly Leu	Lys
230 235	240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr lie Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly	y Arg
245 250	255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser lle Asn Tyr	Arg
260 265	270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Val Pro Gly Phe Lys Gly	
275 280	285
Met Gly Leu Lys Gly Asp Arg Gly Glu Val Gly Gln Ile Gl	y Pro
290 295	300
Arg Gly Xxx Asp Gly Pro Glu Gly Pro Lys Gly Arg Ala Gl	y Pro
305 310	315
Thr Gly Asp Pro Gly Pro Ser Gly Gln Ala Gly Glu Lys Gl	y Lys
320 325	330
Leu Gly Val Pro Gly Leu Pro Gly Tyr Pro Gly Arz Gin G	ly Pro
335 340	345
Lys Gly Ser Thr Gly Phe Pro Gly Phe Pro Gly Ala Asn G	
350 355	35

Lys Gly Ala Arg Gly Val Ala Gly Lys Pro Gly Pro Arg Gly Gln 365 370 375 Arg Gly Pro Thr Gly Pro Arg Gly Ser Arg Gly Ala Arg Gly Pro 380 385 390 Thr Gly Lys Pro Gly Pro Lys Gly Thr Ser Gly Gly Asp Gly Pro 395 400 405 Pro Gly Pro Pro Gly Glu Arg Gly Pro Gln Gly Pro Gln Gly Pro 420 410 415 Val Gly Phe Pro Gly Pro Lys Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Arg 425 430 435 Met Gly Cys Pro Gly His Pro Gly Gln Arg Gly 440 445

配列番号:16

配列の長さ:457

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプテド

配列:

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn lle Gly Pro Asp Thr Met Arg

1 5 10 15

Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser lle Asp Leu Thr Asn Phe Leu
20 25 30

Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	Val	Ala	Glu	Leu
				35					40					45
Ser	lle	Ser	Pro	Ser	Asp	nzk	Ala	Val	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
				50					55					60
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gin
				65					70	•				75
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
				80					85					90
Ser	Pro	Thr	Gly	ile	Asp	Phe	Ser	Asp	lle	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
				95					100	į.				105
Thi	r Va	l His	Trp	lle	Ala	Pro	Arg	, Ala	Thr	lle	Thr	Gly	Tyr	Arg
				110					115	5				120
11	e Ar	g Hi:	s His	Pro	Glu	His	s Ph	e Sei	Giy	/ Arg	Pro	Arg	Glu	ÅSP
				125	5				130)				135
Ar	g Va	l Pr	o Hi	s Se	r Ar	g As	n Se	r II	e Th	r Le	1 The	r Asn	Leu	Thr
				140	0				143	5				150
Pr	o Gl	y Th	r Gl	u Ty	r Va	l Va	l Se	r 11	e Va	IAI	a Le	u Ası	Gly	Arg
				15	5				16	0				165
G I	u G	lu Se	er Pr	o Le	u Le	u II	e Gl	y Gl	n Gl	n Se	r Th	r Va	l Se	r Asp
				17	0				17	5				180
٧	ai P	ro A	rg As	sp Le	u G	lu Va	al V	al Al	la Al	la Ti	ır Pr	o Th	r Se	r Leu
					35					90				195
Ĺ	eu l	le S	er T	rp A	k qz	la P	ro A	la V	al T	hr V	k Is	rg Ty	r Ti	ir Ara
_					00					05				210

ile	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro	Val	Gln	Glu	Phe
			•	215					220					225
Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	He	Ser	Gly	Leu	Lys
				230					235					240
Pro	Gly	Val	Asp	Tyr	Thr	lle	Thr	Val	Tyr	Ala	Val	Thr	Gly	Arg
٠				245	•		·		250					255
Gly	Asp	Ser	.Pro	Ala	Ser	Ser	Lys	Pro	lle	Ser	lle	Asn	Tyr.	Arg
	. ·			260				•	265		•			270
Thr	Glu	lle	Asp	Lys	Pro	Ser	Met	Asn	Val	Ser	Pro	Pro	Arg	Arg
				275					280					285
Ala	Arg	Val	Thr	Asp	Ala	Thr	Glu	Thr	Thr	lle	Thr	lle	Ser	Trp
				290					295					300
Arg	Thr	Lys	Thr	Glu	Thr	lle	Thr	Gly	Phe	Gln	Val	Asp	Ala	lsV
				305				٠.	310					315
Pro	Ala	Asn	Gly	Gln	Thr	Pro	lle	Gin	Arg	Thr	He	Lys	Pro	A·s p
•				320)				325	•	•			330
Val	Arg	s Sei	Tyr	Thr	116	Thr	Gly	Leu	Gin	Pro	Gly	Thr	Asp	Tyr
				335	5				340					345
Lys	5 11	e Ty	r Leu	ı Tyr	Thi	r Lei	ı Asn	Asp	Asn	Ala	Arg	Ser	Ser	Pro
				350)				355	ı				360
V.a	l Va	1 11	e yzi	Ala	a Se	r Thi	r Ala	lle	Asp	Ala	Pro	Ser	Asn	Lei
				363	5				370					375
Ar	g Ph	e Le	u Ala	a Th	r Th	r Pr	ızk o	n Ser	Leu	Let	ı Val	Ser	Trp	Gli
				38	0				385	5				39

Pro Pro Arg Ala Arg lie Thr Gly Tyr lie lie Lys Tyr Glu Lys 405 400 395 Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly 420 415 410 Val Thr Glu Ala Thr lie Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr 435 430 425 Thr lie Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gin Lys Ser Glu Pro 450 445 440 Leu lle Gly Arg Lys Lys Thr 455

配列番号:17

配列の長さ:368

配列の型:アミノ酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプテド

配列:

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn IIe Giy Pro Asp Thr Met Arg

1 5 10 15

Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser IIe Asp Leu Thr Asn Phe Leu
20 25 30

Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu
35 40 45

Ser	lle	Ser	Pro	Ser	ASP	Asn	Ala	Val	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
			•	50		•			55					60
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	lsV	Ser	Va l	Ser	Ser	Va!	Tyr	Glu	Gln
				65					70					75
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gin	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
				80	•				85					90
Ser	Pro	Thr	Gly	lle	Asp	Phe	Ser	Asp	lle	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
				95					100					105
Thr	Val	His	Trp	He	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	l l·e	Thr	Gly	Tyr	Arg
				110					115					120
He	Arg	His	His	Pro	Glu	нis	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Ġlu	Asp
				125					130					135
Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	lle	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr
	÷			140				-	145					150
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	lle	Vai	Ala	Leu	Asn	Gly	Arg
				155	,				160					165
Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	lle	Gly	Gln	Gln	Ser	Thr	۷al	Ser	4sp
				170			·		175					180
Val	Pro	Arg	g Asp	Leu	Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	leu
			,	185					190					195
Lei	116	e Sea	r Trp	Asp	Ala	Pro	Ala	. Val	Thr	۷al	Arg	Tyr	Tyr	Arg
			•	200					205					210
lie	? Thi	ŗīy	Gly	Glu	Thr	Cly	Cly	/ Asn	Ser	Pro	Val	Gln	Glu	Phe
				215	; ·				220)				225

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr lie Ser Gly Leu (ys
230 235	240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr lle Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly	Arg
·	255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr	Arg
•	270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Asp Ala Pro Ser	Asn
275 280	285
Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser	Trp
290 295	300
Gln Pro Pro Arg Ala Arg lie Thr Gly Tyr lle lle Lys Tyr	Glu
305 310	315
Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg	Pro
320 325	330
Gly Val Thr Glu Ala Thr lle Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr	Glu
335 340	345
Tyr Thr lle Tyr Val lle Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser	Glu
350 355	360
Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr	
365	
207	

配列番号:18

配列の長さ:367

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

配列:

Pro	Thr	Asp	Leu	Arg	Phe	Thr	Asn	lle	Gly	Pro	Asp	Thr	Met	Arg
1				5					10					15
Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	He	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu
	•			20		,		•	25					30
Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	Val	Ala	Glu	Leu
				35					40			•	•	45
Ser	lle	Ser	Pro.	Ser	Asp	Aśn	Ala	Va I	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
				50				٠	55				•	60
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Vai	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Clu	Gin
				65			· .		. 70	-	. ·			75
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
				80					85		· .			90
Ser	Pro	Thr	G.l y		Asp	Phe	Ser	λςρ	•	Thr	Ala	Asn	Ser	
Ser	Pro	Thr			Asp	Phe	Ser	λsp	•	Thr	Ala	nzk	Ser	
				11e 95			,		l l e 100					Phe 105.
				11e 95	Дlа		,		l l e 100					Phe 105.
Thr	Val	His		95 11e 110	Ala	Pro	Arg	Ala	lle 100 Thr 115	lle	Thr	Gly	Tyr	Phe 105 Arg 120
Thr	Val	His	Trp	95 11e 110	Ala	Pro	Arg	Ala	lle 100 Thr 115	lle	Thr	Gly	Tyr	Phe 105 Arg 120
Thr	Val Arg	His	Trp	95 11e 110 Pro 125	Ala	Pro	Arg	Ala	lle 100 Thr 115 Gly 130	lle	Thr	Gly	Tyr	Phe 105 Arg 120 Asp 135
Thr	Val Arg	His	Trp	95 11e 110 Pro 125	Ala	Pro	Arg	Ala	lle 100 Thr 115 Gly 130	lle	Thr	Gly	Tyr	Phe 105 Arg 120 Asp 135
Thr	Val Arg	His Pro	Trp	95 11e 110 Pro 125 Ser 140	Ala	Pro His	Arg Phe Ser	Ala	11e 100 Thr 115 Gly 130 Thr 145	lle	Thr Pro	Gly Arg Asn	Tyr Glu Leu	Phe 105 Arg 120 Asp 135 Thr 150

Glu Glu Ser Pro Leu Leu lle Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp
170 175 180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu
185 190 195
Leu lle Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg
200 205 210
lle Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
215 220 225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr lie Ser Gly Leu Lys
230 235 240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr lie Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg
245 250 255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro 11e Ser 11e Asn Tyr Arg
260 265 270
Thr Glu lie Asp Lys Pro Ser Met Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg
275 280 285
Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr lie Thr lie Ser Trp
290 295 300
Arg Thr Lys Thr Glu Thr lle Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val
305 310
Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro lle Gln Arg Thr lle Lys Pro Ass
320 325 330
Val Arg Ser Tyr Thr lie Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Ty
335 340

Lys lle Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro 350 355 360

Val Val lie Asp Ala Ser Thr

365

配列番号:19

配列の長さ:464

配列の型:アミノ酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類:ペプチド

配列:

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn lie Gly Pro Asp Thr Met Arg 15 10 Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu 30 20 25 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu. 40 45 35 Ser lie Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu 60 50 . 55 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln 75 70 65 His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp 85 80

Ser Pro Thr Gly lle Asp Phe Ser Asp lle Thr Ala Asn Ser Phe
95 100 105
Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg
110 115 120
lle Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp
125 130 135
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr
140 145 150
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser lie Val Ala Leu Asn Gly Arg
155 160 165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu lie Gly Gin Gin Ser Thr Val Ser Asp
170 175 180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu
185 190 195
Leu lle Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg
200 205 210
lie Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Ph
215 220 22
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr lie Ser Gly Leu Ly
230 235 24
Pro Gly Val Asp Tyr Thr ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Ar
245 250 25
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro 11e Ser 11e Asn Tyr A
260 265 2

	Thr	Glu	lle	Asp	Lys	Pro	Ser	Met	Gly	lle	Arg	Gly	Leu	Lys	Gly
					275	•	•			280					285
	Thr	Lys	Gly	Glu	Lys	Gly	Glu	Asp	Gly	Phe	Pro	G l ₋ y	Phe	Lys	Gly
					290					295					300
	Asp	Met	Gly	lle	Ĺys	Gly	Asp	Arg	Gly	Glu	lle	Gly	Pro	Pro	Cly
•	٠				305					310	•				315
	Pro	Arg	Gly	Gļu	Asp	Gly	Pro	Glu	Gly	Pro	Lys	Gly	Arz	Gly	Gly
					320				٠	325					330
	Pro	Asn	Gly	Asp	Pro	Gly	Pro	Leu	Gly	Pro	Pro	Gly	Glu	Lys	Gly
	÷				335					340					345
•	Lys	Leu	Gly	Va i	Pro	Gly	Leu	Pro	Gly	Tyr	Pro	Gly	Arg	Glin	Gly
					350					355					360
	Pro	Lys	Gly	Ser	lle	Gly	Phe	Pro	Gly	Phe	Pro	Gly	Ala	Asn	Gly
					365			•	· · ·	370					375
	Gļu	Lys	Gly	Gly	Arg	Gly	Thr	Pro	Gly	Lys	Pro	Gly	Pro	Arg	Gly
					380	•				385		• .			390
	Gln	Arg	Gly	Pro	Thr	Gly	Pro	Arg	Gly	Glu	Arg	Gly	Pro	Arg	Gly.
					395					400					405
	lie	Thr	Gly	iys	Pro	Gly	Pro	Lys	Gly	Asn	Ser	Gly	Gly	Asp	Giy
					410					415					420
	Pro	Ala	Gly	Pro	Pro	Gly	Glu	Arg	Gly	Pro	Asn	Gly	Pro	Gln	Gly
		·			425					430					435
	Pro	Thr	Gly	Phe	Pro	Gly	Pro	Lys	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly
					440	-				445					450

Lys Asp Gly Leu Pro Gly His Pro Gly Gln Arg Gly Glu Thr
455
460

配列番号:20

配列の長さ:432

配列の型:アミノ酸

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

配列:

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg 15 10 5 Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser lle Asp Leu Thr Asn Phe Leu 30 25 20 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu 45 40 35 Ser lie Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu 60 55 50 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gin 75 70 65 His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp 90 85 80 Ser Pro Thr Gly lie Asp Phe Ser Asp lie Thr Ala Asa Ser Phe 105 100 95

Thr	Val	His	Trp	He	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	lle	Thr	Gly	Tyr	Arg
	• .		•	110					115					120
lle	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Årg	Glu	Asp
				125					130			•,		135
Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	He	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr
· .				140					145					150
Pro	Gly	Thr	G _{1.u}	Tyr	Val	Val	Ser	lle	Val	Ala	Leu	Asn	Gly	Arg
				155					160	٠				165
Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	He	Gly	Gin	Gln	Ser	Thr	Val	Ser	Asp
	,			170					175					180
Val	Pro	Arg	Ąsp	Leu	Glu	Val	Va!	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu
				185					190					195
Leu	lle	Ser	Trp	Asp	Ala	Pro	Ala	Val	Thr	Val	Arg	Tyr	Tyr	Arg
				200		-			205					210
lle	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Åsn	Ser	Pro	Val	Gln	Glu	Phe
				215	•				220					225
Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	ile	Ser	Gly	Leu	Lys
				230					235					240
Pro	GLy	y Val	qzk İ	Tyr	The	116	? The	· Val			Val	Thr	Gly	Arg
				245	-				250				_	255
G1:	y	p Se	r Pro	Ala	a Sei	r Sei	r Ly:	s Pro	lle	Ser	· []s	izk ;	ı Tyr	. YLB
			•	260					265					270
Th	r Gl	u _. []	e ysi	Ly	s Pr	o Se	r Me	t Ala			y Sei	r []	e Thi	Thr
				27	5 ·				280	0				285

290 295 300 Gly His Phe Lys Asp Pro Lys Arg Leu Tyr Cys Lys Asn Gly Gly 305 310 315 Phe Phe Leu Arg Ile His Pro Asp Gly Arg Val Asp Gly Val Arg 320 325 330 Glu Lys Ser Asp Pro His Ile Lys Leu Gln Leu Gln Ala Glu Glu 335 340 345 Arg Gly Val Val Ser Ile Lys Gly Val Cys Ala Asn Arg Tyr Leu 350 355 360 Ala Met Lys Glu Asp Gly Arg Leu Leu Ala Ser Lys Cys Val Thr 365 370 375 Asp Glu Cys Phe Phe Phe Glu Arg Leu Glu Ser Asn Asn Tyr Asn 380 385 390 Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Trp Tyr Val Ala Leu Lys 395 400 405 Arg Thr Gly Gln Tyr Lys Leu Gly Ser Lys Thr Gly Pro Gly Gl 410 415 42	Leu Pro Ala Leu Pro Glu Asp Gly Gly Ser Gly Ala Phe Pro Pr	0
305 310 315 Phe Phe Leu Arg I le His Pro Asp Gly Arg Val Asp Gly Val Arg 320 325 330 Glu Lys Ser Asp Pro His I le Lys Leu Gln Leu Gln Ala Glu Glu 335 340 345 Arg Gly Val Val Ser I le Lys Gly Val Cys Ala Asn Arg Tyr Leu 350 355 360 Ala Met Lys Glu Asp Gly Arg Leu Leu Ala Ser Lys Cys Val Thr 365 370 375 Asp Glu Cys Phe Phe Phe Glu Arg Leu Glu Ser Asn Asn Tyr Asn 380 385 390 Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Trp Tyr Val Ala Leu Lys 395 400 405 Arg Thr Gly Gln Tyr Lys Leu Gly Ser Lys Thr Gly Pro Gly Gl 410 415 42	30	
305 310 315 Phe Phe Leu Arg I le His Pro Asp Gly Arg Val Asp Gly Val Arg 320 325 330 Glu Lys Ser Asp Pro His I le Lys Leu Gln Leu Gln Ala Glu Glu 335 340 345 Arg Gly Val Val Ser I le Lys Gly Val Cys Ala Asn Arg Tyr Leu 350 355 360 Ala Met Lys Glu Asp Gly Arg Leu Leu Ala Ser Lys Cys Val Thr 365 370 375 Asp Glu Cys Phe Phe Phe Glu Arg Leu Glu Ser Asn Asn Tyr Asn 380 385 390 Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Trp Tyr Val Ala Leu Lys 395 400 405 Arg Thr Gly Gln Tyr Lys Leu Gly Ser Lys Thr Gly Pro Gly Gl 410 415 42	Cly His Phe Lys Asp Pro Lys Arg Leu Tyr Cys Lys Asn Gly Gl	y -
Phe Phe Leu Arg I ie His Pro Asp Gly Arg Val Asp Gly Val Arg 320 325 330 Glu Lys Ser Asp Pro His I ie Lys Leu Gin Leu Gin Ala Glu Giu 335 340 345 Arg Gly Val Val Ser I ie Lys Gly Val Cys Ala Asn Arg Tyr Leu 350 355 360 Ala Met Lys Glu Asp Gly Arg Leu Leu Ala Ser Lys Cys Val Thr 365 370 375 Asp Glu Cys Phe Phe Phe Glu Arg Leu Glu Ser Asn Asn Tyr Asn 380 385 390 Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Trp Tyr Val Ala Leu Lys 395 400 405 Arg Thr Gly Gln Tyr Lys Leu Gly Ser Lys Thr Gly Pro Gly Gl 410 415 42	31	
320 325 330 Glu Lys Ser Asp Pro His IIe Lys Leu Gln Leu Gln Ala Glu Glu 335 340 345 Arg Gly Val Val Ser IIe Lys Gly Val Cys Ala Asn Arg Tyr Leu 350 355 360 Ala Met Lys Glu Asp Gly Arg Leu Leu Ala Ser Lys Cys Val Thr 365 370 375 Asp Glu Cys Phe Phe Phe Glu Arg Leu Glu Ser Asn Asn Tyr Asn 380 385 390 Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Trp Tyr Val Ala Leu Lys 395 400 405 Arg Thr Gly Gln Tyr Lys Leu Gly Ser Lys Thr Gly Pro Gly Gl 410 415 42	•	rg
Arg Giy Val Val Ser Ile Lys Giy Val Cys Ala Asn Arg Tyr Leu 350 355 360 Ala Met Lys Giu Asp Giy Arg Leu Leu Ala Ser Lys Cys Val Thr 365 370 375 Asp Giu Cys Phe Phe Phe Giu Arg Leu Giu Ser Asn Asn Tyr Asn 380 385 390 Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Trp Tyr Val Ala Leu Lys 395 400 405 Arg Thr Giy Gin Tyr Lys Leu Giy Ser Lys Thr Giy Pro Giy Gi 415 42	2	
Arg Giy Val Val Ser Ile Lys Giy Val Cys Ala Asn Arg Tyr Leu 350 355 360 Ala Met Lys Giu Asp Giy Arg Leu Leu Ala Ser Lys Cys Val Thr 365 370 375 Asp Giu Cys Phe Phe Phe Giu Arg Leu Giu Ser Asn Asn Tyr Asn 380 385 390 Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Trp Tyr Val Ala Leu Lys 395 400 405 Arg Thr Giy Gin Tyr Lys Leu Giy Ser Lys Thr Giy Pro Giy Gi 415 42	Glu Lys Ser Asp Pro His Ile Lys Leu Gln Leu Gln Ala Glu G	iu
350 355 360 Ala Met Lys Glu Asp Gly Arg Leu Leu Ala Ser Lys Cys Val Thr 365 370 375 Asp Glu Cys Phe Phe Phe Glu Arg Leu Glu Ser Asn Asn Tyr Asn 380 385 390 Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Trp Tyr Val Ala Leu Lys 395 400 405 Arg Thr Gly Gln Tyr Lys Leu Gly Ser Lys Thr Gly Pro Gly Gl 410 415 42	2.0	
350 355 360 Ala Met Lys Glu Asp Gly Arg Leu Leu Ala Ser Lys Cys Val Thr 365 370 375 Asp Glu Cys Phe Phe Phe Glu Arg Leu Glu Ser Asn Asn Tyr Asn 380 385 390 Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Trp Tyr Val Ala Leu Lys 395 400 405 Arg Thr Gly Gln Tyr Lys Leu Gly Ser Lys Thr Gly Pro Gly Gl 410 415 42	Arg Gly Val Val Ser lle Lys Gly Val Cys Ala Asn Arg Tyr L	,eu
Asp Giu Cys Phe Phe Phe Giu Arg Leu Giu Ser Asn Asn Tyr Asn 380 385 390 Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Trp Tyr Val Ala Leu Lys 395 400 405 Arg Thr Gly Gin Tyr Lys Leu Gly Ser Lys Thr Gly Pro Gly Gi 410 415 42	0	
Asp Giu Cys Phe Phe Phe Giu Arg Leu Giu Ser Asn Asn Tyr Asn 380 385 390 Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Trp Tyr Val Ala Leu Lys 395 400 405 Arg Thr Gly Gin Tyr Lys Leu Gly Ser Lys Thr Gly Pro Gly Gi 410 415 42	Ala Met Lys Glu Asp Gly Arg Leu Leu Ala Ser Lys Cys Val	ſhr
Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Trp Tyr Val Ala Leu Lys 395 400 405 Arg Thr Gly Gln Tyr Lys Leu Gly Ser Lys Thr Gly Pro Gly Gi 410 415	270	_
Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Trp Tyr Val Ala Leu Lys 395 400 405 Arg Thr Gly Gln Tyr Lys Leu Gly Ser Lys Thr Gly Pro Gly Gi 410 415	Asp Glu Cys Phe Phe Phe Glu Arg Leu Glu Ser Asn Asn Tyr	Asn
395 400 405 Arg Thr Gly Gln Tyr Lys Leu Gly Ser Lys Thr Gly Pro Gly Gl 410 415	າດຕັ	390
395 400 405 Arg Thr Gly Gln Tyr Lys Leu Gly Ser Lys Thr Gly Pro Gly Gl 410 415	Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Trp Tyr Val Ala Leu	Lys
410 415 42		405
410 415 42	Arg Thr Gly Gln Tyr Lys Leu Gly Ser Lys Thr Gly Pro Gly	Gin
Dhe leu Pro Met Ser Ala Lys Ser		420
Lys Ala lie Leu Phe Leu ito met dei mit	Lys Ala lie Leu Phe Leu Pro Met Ser Ala Lys Ser	
425 430	400	

配列香号:21

配列の長さ:574

配列の型:アミノ酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類:ペプテド

配列:

	Pro	Thr	Asp	Leu	Arg	Phe	Thr	Asn	lle	Gly	Pro	Asp	Thr	Met	Arg	
	1			•	5					10					15	
	Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	ile	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu	
					20				·	25					30	
	Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	Val	Ala	Glu	Leu	
	•				35					40					45	
	Ser	He	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Val	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu	
					-50					55					60	
	Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Va l	Tyr	Glu	Gln	
					65					70					75	
•	His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp	
					80					85					90	
	Ser	Pro	Thr	Gly	lle	Asp	Phe	Ser	Asp	lle	Thr	Alā	Asn	Ser	Phe	
					95					100					105	
	Thr	Val	His	Trp	ile	Ala	Pro	Arg	Аlа	Thr	lle	Thr	Gly	Tyr	Arg	
			· . ·		110					115					120	
	He	Arg	g His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp	
					125)				130					135	
	λrg	Val	l Pro	His	s Ser	Arg	a Asr	Ser	lle	Thr	Leu	Thr	Asr	Leu	Thr	
			-		140					145	•	•			150	
	Pro	Gl	y Th	r Gli	и Туг	Val	l Va	l Ser	ile	. Val	Ala	leu	1 451	Gly	Arg	
					15	5				160)				165	

Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp
170 175 180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu
185 190 195
Leu lle Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg
200 205 210
lle Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
215 220 225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr lie Ser Gly Leu Lys
230 235 240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr lle Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg
245 250 255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro 11e Ser 11e Asn Tyr Arg
260 265 270
Thr Glu lie Asp Lys Pro Ser Met Ala lie Pro Ala Pro Thr Asp
275 280 285
Leu Lys Phe Thr Gln Yal Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp
290 295 300
Thr Pro Pro Asn Val Gin Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr
305 310
Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu lle Asn Leu Ala Pro
320 325 330
Asp Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys
335 340 345

Tyr	Glu	Val	Ser	Val	Tyr	Ala	Leu	Lys	YZĎ	Thr	Leu	Thr	Ser	Arg
			•	350	.•				355			•		360
Pro	Ala	Gin	Gly	Vai	Val	Thr	Thr	Leu	Glu	Asn	Val	Ser	Pro	Pro
				365					370			•		375
Arg	λrg	Ala	Arg	Val	Thr	qzλ	Ala	Thr	Glu	Thr	Thr	lle	Thr	lle
•				380	٠.				385					390
Ser	Tr.p	λrg	Thr	Lys	Thr	C l·u	Thr	lle	Thr	Gly	Phe	Gla	Val	Asp
				395					400					405
Ala	Val	Pro	Äla	Asn	Gly	Gln	Thr	Pro	lle	GIn.	Arg	Thr	lle	Lys
				410					415					420
Pro	Asp	Val	Arg	Ser	Tyr	Thr	He	Thr	Gly	Leu	Gin	Pro	Gľy	Thr
		•		425					430				·	435
Asp	Tyr	Lys	lle	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Leu	nzk	Asp	λsπ	Ala	Arg	Ser
				440					445					450
Ser	Pro	Val	Val	lle	Asp	Ala	Ser	Thr	Ala	lle	Asp	Ala	Pro	Ser
•				455	•				460		• •			465
Asn	Leu	i Arg	Phe	Leu	Ala	Thr	Thr	Pro	γsυ	Ser	Leu	Leu	Val	Ser.
•				470					475					480
Tr	Glr	r Pro	Pro	Arg	Ala	A12	lle	Thr	Gly	Tyr	ile	He	ĹÿS	Tyr
				485					490					495
Gle	ı Lys	s Pro	o Gly	y Ser	Pro	Pro	Arg	G G I u	l Val	V a l	Pro	Arg	Pro	Arg
				500					505					510
Pro	o Gly	y Va	1 Th	r Gli	ı 'Ala	Thi	r 11e	e Thi			Glu	Pro) Gly	Thr
				513	5				520)				525

Glu	Tyr	Thr	lle	Tyr	Val	lle	Ala	Leu	Lys	Asn	Asn	Gin	Lys	Ser
	·			530					535					540
Glu	Pro	Leu	He	Gly	Arg	Lys	Lys	Thr	Asp	Glu	Leu	Pro	Gln	Leu
				545					550					555
Val	Thr	Leu	Pro	His	Pro	Asn	Leu	His	Gly	Pro	Glu	ile	Leu	Asp
				560					565					570
Val	Pro) Ser	Thr	•										

請求の範囲

- 1. 穿孔法を用いて外来遺伝子を標的細胞に導入し形質転換細胞を製造する方法において、穿孔法を用いて標的細胞内に外来遺伝子の注入操作を行った後、該細胞を細胞接着活性物質の存在下で培養する工程を包含することを特徴とする外来遺伝子による形質転換細胞の製造方法。
- 2. 培養工程が、細胞接着活性物質を被覆した培養器具を用いて培養する工程である請求項1記載の形質転換細胞の製造方法。
- 3. 細胞接着活性物質が、細胞接着活性ポリペプチドまたは該ポリペプチドの機能的同等物である請求項1記載の形質転換細胞の製造方法。
- 4. 細胞接着活性ポリペプチドが、細胞接着伸展活性ポリペプチドである請求項3記載の形質転換細胞の製造方法。
- 5. 細胞接着伸展活性ポリペプチドが、配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列および/または配列表の配列番号2で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドである請求項3記載の形質転換細胞の製造方法。
- 6. 細胞接着活性ポリペプチドが、配列表の配列番号3、4および5で表されるポリペプチドから選択される請求項3記載の形質転換細胞の製造方法。
- 7. 細胞接着性物質がポリーN-p-ビニルベンジルーD-ラクトンアミドである請求項1記載の形質転換細胞の製造方法。
- 8. 標的細胞が造血幹細胞、末梢血幹細胞、臍帯血細胞、ES細胞、リンパ球、癌細胞から選択される細胞である請求項1記載の形質転換細胞の製造方法。
- 9. 外来遺伝子がタンパク質をコードする核酸、ポリペプチドをコード する核酸、アンチセンスDNA、アンチセンスRNA、リボザイム、細胞

内抗体をコードする核酸、偽 (デコイ) 遺伝子から選択される核酸である 請求項1記載の形質転換細胞の製造方法。

- 10. 外来遺伝子がタンパク質をコードする核酸、ポリペプチドをコードする核酸、アンチセンスDNA、アンチセンスRNA、リボザイム、細胞内抗体をコードする核酸、偽(デコイ)遺伝子から選択される核酸であり、該核酸がベクターに組み込まれている請求項1記載の形質転換細胞の製造方法。
- 11. ベクターがレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、 ワクシニアウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクターから選択される ベクターである請求項1記載の形質転換細胞の製造方法。
- 12. 穿孔法がエレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法およびパーティクルガン法から選択される請求項1記載の形質転換細胞の製造方法。
- 13. 請求項1記載の形質転換細胞の製造方法によって製造される外来 遺伝子による形質転換細胞。
- 14. 請求項1記載の形質転換細胞の製造方法に使用するキットであって、細胞接着活性物質を含有することを特徴とする外来遺伝子による形質 転換細胞の製造用キット。



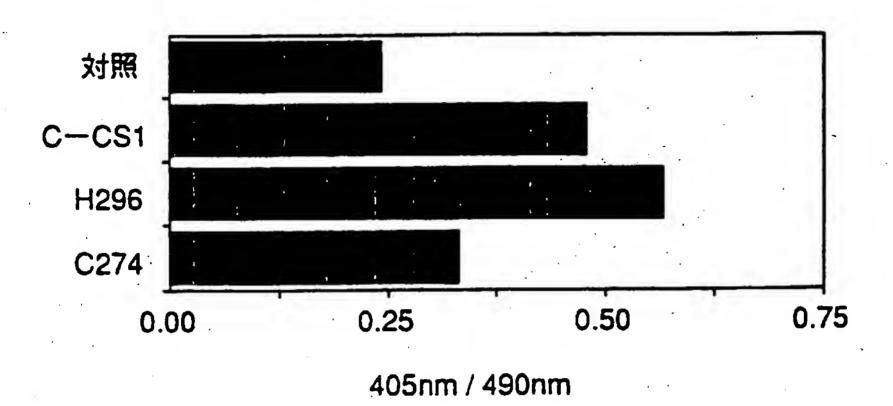
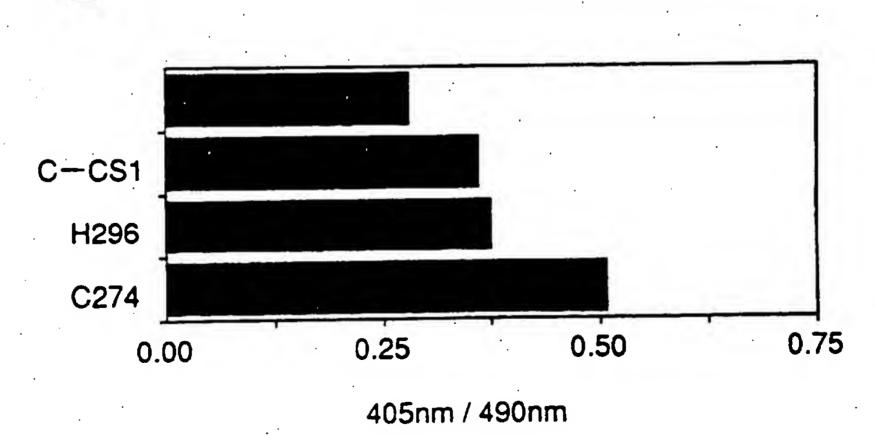


図2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP95/02425

•	والمراجع والم والمراجع والمراجع والمراجع والمراجع والمراجع والمراجع والمراج						
. CLAS	SIFICATION OF SUBJECT MATTER	7714/70					
Int.	C16 C12N15/87, C12N5/10, C07	M12//U					
cording to	International Patent Classification (IPC) or to both natio	onal classification and if C					
FIELD	S SEARCHED	-ification symbols)					
nimum doc	umentation searched (classification system followed by class	sincauos symoos)					
	C16 C12N15/87, C12N5/10, C07						
cumentatio	n searched other than minimum documentation to the exten	t that such documents are included in th	e fields searched				
	a base consulted during the international search (name of da	ta base and, where practicable, search to	erms used)				
WPI,	WPI/L, BIOSIS PREVIEWS						
DOCUI	MENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		a de la la la la la la la la la la la la la				
ategory*	Citation of document, with indication, where appro	opriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.				
A	JP, 4-063597, A (W.R. Grace & Co.), February 28, 1992 (28. 02. 92)						
A	& EP, 463508, A & CA, 2044307, A JP, 6-090771, A (Shiseido Co., Ltd.), April 5, 1994 (05. 04. 94) (Family: none)						
•							
,							
Fuel	her documents are listed in the continuation of Box C.	Sec patent family annex.					
• Speci	al categories of cited documents:	"I" later document published after the it date and not in conflict with the ap the principle or theory underlying	the invention				
"E" earlie	of particular recevances of particular receivances filling date of document but published on or after the international filling date of document but published on or after the international filling date.	"X" document of particular relevance; considered novel or cannot be con step when the document is taken a	loss				
cited speci "O" docu	to establish the patriculous data of the sale of the s		sch documents, such combination				
"P" docu	ment published prior to the international filing date but inter than riority date cinimed	"A" document member of the same pe	ten family				
Date of the	ch 1, 1996 (01. 03. 96)	Date of mailing of the international March 19, 1996	19. 03. 96)				
	d mailing address of the ISA/	Authorized officer					
TAT.	panese Patent Office						
Facsimil		Telephone No.					
I							

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

A. 発明の	属する分野の分類(国際	条特許分類(IPC))			
	Int. CL6	C12N15/87,	C12N5/10.	C 0 7 K	14/78
B. 腐蚕を作	テった分野				
調査を行った最	及小租資料(国際特許	分類(IPC))			
	Int. CL	C12N15/87,	C12N5/10.	C 0 7 K	14/78
最小限費料以外	トの資料で調査を行った	た分野に含まれるもの			· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
国際調査で使用	用した電子データベー	ス(データベースの名称、調査に	使用した用語)		
	WPI, WP	I/L, BIOSIS LINE	PREVIEWS		· .
C. 関連する	ると認められる文献				
引用文献の カテゴリーキ	引用文献	名 及び一部の箇所が関連する	ときは、その関連する箇所の	表示	関連する 請求の範囲の番号
A	アンド・カン 28.2月.	63597, A(ダブ! パニー コーン), 1992(28.02. 3508, A&CA, 2	92)	ース・	1-14
A	JP, 6-0 5.4月.1	90771。A(株式: 994(05.04.9	会社	にし)	1-14
□ C 雷の統	きにも文献が列挙され	ている。	□ パテントファミリ	ーに関する別紙	を参照。
「E」先行文 「L」優先権 若しく で理由 「O」ロ頭に 「P」国際出	達のある文献ではなく 献ではあるが、国際出 主張に疑義を提起する は他の特別な理由を確 を付す) よる開示、使用、展示	、一般的技術水準を示すもの 顧日以後に公表されたもの 文献又は他の文献の発行日 立するために引用する文献 等に営及する文献 の主張の基礎となる出願の日	に引用するもの 「X」特に関連のある文献 性又は進歩性がない 「Y」特に関連のある文献	く、発明の原理 であって、当該 と考えられるも であって、当該 って自明である もの	又は理論の理解のため 文献のみで発明の新規 の
国際調査を完	了した日 01.03	. 9 6	国際調査報告の発送日	9.03.9	6
	本国特許庁(IS 新聞表号100	SA/JP) 関三丁目 4 番 3 号	特許庁等査官(権限のある報酬 高 掲 栄 電話書号 03-3581-1	=	B 9 2 8 1 3 4 4 9

THIS PAGF BLANK (USPTO)

This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

□ BLACK BORDERS
□ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
□ FADED TEXT OR DRAWING
□ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
□ SKEWED/SLANTED IMAGES
□ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
□ GRAY SCALE DOCUMENTS
□ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
□ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

OTHER:

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)